

PTO 2002-2547

S.T.I.C. Translations Branch

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-339164

(43)公開日 平成5年(1993)12月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 37/02	ABY	8314-4C		
	ADU			
	ADY			
9/00	V	7329-4C		
47/34	E	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数6(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-33424

(22)出願日 平成5年(1993)2月23日

(31)優先権主張番号 特願平4-43383

(32)優先日 平4(1992)2月28日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72)発明者 栗津 荘司

埼玉県川口市芝中田1-23-23

(72)発明者 林 正弘

神奈川県茅ヶ崎市東海岸南1-13-3

(72)発明者 町田 実

東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

(54)【発明の名称】 経粘膜投与剤

(57)【要約】

【構成】 ヒトG-CSFを有効成分とする経粘膜投与剤。さらに詳しくは、ヒトG-CSF単独もしくは、ヒトG-CSFにポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系又はポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル系から選択される非イオン性界面活性剤である吸収促進剤を添加した経粘膜投与剤。

【効果】 優れた経粘膜吸収を持つヒトG-CSF投与剤を提供することに成功した。この結果、ヒトG-CSFの投与を容易かつ効率的に行うことならびに局所および全身においても効果が発揮され、適応する疾患に応じた広い治療領域で使用することが可能になった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト顆粒球コロニー刺激因子を有効成分とする経粘膜投与剤。

【請求項2】 経粘膜投与剤が経肺投与剤である請求項1記載の経粘膜投与剤。

【請求項3】 ヒト顆粒球コロニー刺激因子および吸収促進剤を含有する経粘膜投与剤。

【請求項4】 吸収促進剤が、ポリオキシエチレン(4.2)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(21)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(7)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1つの界面活性剤である請求項3記載の経粘膜投与剤。

【請求項5】 ヒト顆粒球コロニー刺激因子および吸収促進剤を含有する経鼻または経肺投与剤。

【請求項6】 吸進促進剤が、ポリオキシエチレン(4.2)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(21)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(7)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1つの界面活性剤である請求項5記載の経鼻または経肺投与剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒト顆粒球コロニー刺激因子(以下、ヒトG-CSFと略記する)を有効成分として含有する経粘膜投与用製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトG-CSFは*in vitro*の実験系において顆粒球の前駆細胞に働き顆粒球への分化増殖を促す機能を有している液性の造血因子(例えば、Metcalfe, et. al: Exp. Hematol. 1, 185, (1973)等参照)として知られている。さらに最近では、ヒトG-CSFの機能として好中球のプールからの血管内への遊出促進、遊走能亢進、好中球生存期間の延長および好中球活性化(食食、殺菌能亢進)などが知られている。

【0003】現在、ヒトG-CSFは、骨髓移植(BM

T)の際、および癌化学療法時の好中球減少症、種々の骨髓性血液疾患、後天性免疫不全症候群(AIDS)および感染症の治療に際し、静脈内投与および皮下投与が行われている。これ等疾患はいずれも重篤であり、しかも連日の投与による治療を必要とすることから、注射の投与による苦痛をなくするため、非-非経口投与(Non-parenteral)ルートの開発が望まれている。

【0004】今までに薬理的に活性なペプチド及び蛋白質の経口投与による生物学的利用能の検討が試みられているが、胃腸管に存在する蛋白質分解酵素的作用により、一般の薬物に比べて低いことが知られている。このため蛋白質分解酵素の活性が胃腸管に比べて低いことが期待される鼻粘膜、口腔粘膜、直腸粘膜、膣粘膜、眼粘膜および肺粘膜等を介した投与ルートの研究が注目されている。中でも蛋白質の経鼻からの透過性については、投与方法の容易さ、胃腸管よりも蛋白質分解酵素活性が低いこと、肝初回通過効果の回避の可能性のあること、あるいは投与後循環血中に比較的速やかに出現するという幾つかの有利さから多くの研究報告がある(Y. W. Chien et al; CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 4 (2): 67-194 (1987))。

【0005】インスリン、インターフェロン、カルシトニンなどについては経鼻投与が検討され、特許出願もされている(特開昭63-115821号、特開昭62-207226号及び特開昭61-126034号参照)。

【0006】ヒトG-CSFの経鼻投与については、東らがセンダイウイルスによる局所感染に対するヒトG-CSFの防御効果を検討している(東ら、Vaccine, 7: 229-233 (1989))。しかしながら、本発明とは異なりを目的とし、吸収率をあげるために吸収促進剤を用いているものではない。

【0007】なお、インターフェロン、カルシトニンなどについては、経肺投与が検討され、特許出願(特開昭63-51868号および特開昭60-161924号)されているが、ヒトG-CSFの経肺投与についての報告は現在のところなされていない。

【0008】

【発明が解決しようとする問題点】経鼻投与では、分子量が約1,000以下の蛋白質はそのままで良好に吸収されるが、それ以上の分子量のものはそのままでは粘膜透過しないと言われている(C. McMartin, et al: J. Pharm. Sci., 76 (7): 535-540 (1987))。これに対して、ヒトG-CSFの分子量は20,000前後であるため、粘膜を通して投与することは困難であるとされていた。したがって各粘膜からの吸収率をあげるための簡便な方法およびすぐれた吸収促進剤の開発が望まれていた。

【0009】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、ヒトG-CSFの吸収を促進させ、かつ実用に供し得る経粘膜投与形態について鋭意研究を重ねた結果、ある種のポリオキシエチレンアルキルエーテル系及びポリオキシエチレンポリプロピレンアルキルエーテル系の非イオン性界面活性剤を吸収促進剤としてヒトG-CSF経鼻投与剤に添加したところ速やかに吸収されることを見出した。また、吸収促進剤を用いずにヒトG-CSFを経肺投与したところ意外にも良好に吸収され、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系非イオン性界面活性剤を吸収促進剤として添加したところさらに速やかに吸収され、各々の粘膜にヒトG-CSF単独でも、吸収促進剤を添加しても局所および全身作用として有用であることを見出し本発明を完成した。

【0010】すなわち本発明は、ヒトG-CSFを有効成分として含有する経粘膜剤、ヒトG-CSFおよび吸収促進剤を含有する経粘膜剤または、ヒトG-CSFと、吸収促進剤としてポリオキシエチレン(4.2)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(21)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(7)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1つの界面活性剤とを含有する経粘膜投与用製剤に関するものである。

【0011】本発明で用いられるヒトG-CSFは純度の高いヒトG-CSFであればその由来が制限されるものではなく、例えば人の生体試料から抽出、分離、精製したもの、ヒトG-CSF産生細胞を培養し、その培養上清から単離したもの、細胞融合法を用いてヒトG-CSF産生ハイブリドーマを形成しそれから取得したもの、遺伝子組換えによって、大腸菌、動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめ単離精製したもの、又は天然のヒトG-CSFのアミノ酸配列に化学修飾を施したもの等のいずれも使用することができる。

【0012】本発明に供せられうるヒトG-CSFの例としては、下記のアミノ酸配列であらわされるヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたはこれと糖鎖部を有する糖蛋白質を挙げることができる。

【0013】

(Met)_n Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)_m Cys Ala Thr

Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu
Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu
Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp
Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr
Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala
Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
Leu Ala Gln Pro (但しmは0または1を表し、nは0
または1を表す)

さらに、上記アミノ酸配列の一部を別のアミノ酸を付加し又は置換して改変したもの、アミノ酸配列の一部を欠損させたもの、またはアミノ酸配列に高分子化合物等の化合物を結合させて化学修飾したもの等のヒトG-CSF活性を有するポリペプチド類も本発明の範囲に含まれる。

【0014】上記のヒトG-CSFは例えば、本出願人が先に出願した特開昭61-227526号、特開昭62-236497号、特開昭62-236488号の各明細書に記載の方法によって製造することができる。また、その他の方法としてG-CSF産生細胞と自己増殖能を有する悪性腫瘍とを細胞融合して得られるハイブリドーマをマイトジェンの存在または非存在下で培養することによって得ることもできる。これらの方法で得たヒトG-CSFは全て本発明に含まれる。

【0015】得られたヒトG-CSF含有液は必要により公知の手段でさらに精製、濃縮した後、ミリボアフィルター等で無菌濾過して凍結保存とするかまたは凍結乾燥、真空乾燥などの手段により水分を除去して保存することができる。

【0016】本発明の吸収促進剤としては、ポリオキシエチレン(POEと略記する)(4.2)ラウリルエーテル、POE(9)ラウリルエーテル、POE(10)ラウリルエーテル、POE(21)ラウリルエーテル、POE(7)オレイルエーテル、POE(10)オレイルエーテル、およびPOE(20)オレイルエーテルからなる群より選ばれるポリオキシエチレンアルキルエーテル系非イオン性界面活性剤、またはPOE(10)ノニルフェニルエーテルおよび、POE(10)オクチルフェニルエーテルからなる群より選ばれるポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系非イオン性界面活性剤またはPOE(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテル(ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン系非イオン性界面活性剤)(日本エマルジョン社製又は、日光ケミカルズ社製)のうち1または2以上の界面活性剤が用いられる。

【0017】そして、上記界面活性剤のうちHLBが10以上であるもの、または、それらの2以上の組み合わせによりHLBが10以上になるような混合物を用いることにより、望ましい効果が得られる。

【0018】この製剤が適用可能な粘膜としては、鼻腔、口腔、眼、肺、子宮、膣、直腸などの粘膜が考えられ、全身または局所でのヒトG-CSFの作用が期待できる部位が望ましい。

【0019】投与剤形は、ヒトG-CSFまたはヒトG-CSFおよび上記の界面活性剤を粘膜に適用できる水などの液体希釈剤に溶解あるいは懸濁して水性溶液もしくはヒドロゲル（徐放性ゲルにしても良い）とするか、またはガス状の媒体に分散させエアゾール、噴霧スプレーとするか、または、粉末状の担体中に希釈して微粉末製剤とするか、または、軟膏剤または、クリーム剤とすることができる。更に、坐薬のような固形剤にすることもできる。

【0020】液体希釈剤としては注射用水またはリン酸、炭酸などの無機酸の緩衝液または酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-リン酸、酒石酸などの有機酸の緩衝液またはアミノ酸の溶液または、生理的食塩水などが用いられ、pH3~8の範囲での適用が可能である。

【0021】また、本発明の製剤には適宜、安定化剤、増粘剤、溶解補助剤、保存剤、増量剤、等張化剤、殺菌剤、防腐剤、ゲル化剤などを含有していてもよい。また、本発明の非イオン性界面活性剤以外の界面活性剤を安定化剤（吸着防止剤など）分散剤に用いることもできる。さらに肺に適用する場合は、気管支拡張剤または肺表面活性物質などを用いることによりさらに効果が期待される。

【0022】本発明をさらに有効に利用する方法として、製剤の粘度を上げる技術（特開昭61-106509号）、付着粒子をつくる技術または、粘膜刺激を緩和*

$$\text{利用率 (\%)} = \frac{\text{AUC(in)} - \text{AUC(Cont)}}{\text{AUC(sc)} - \text{AUC(Cont)}} \times \frac{\text{sc 投与量}}{\text{in 投与量}} \times 100$$

$$\text{増加率 (\%)} = \frac{\text{利用率 (rhG-CSF + 吸収促進剤)}}{\text{利用率 (rhG-CSF)}} \times 100$$

in: 経鼻投与

sc: 皮下投与

Cont: 生理的食塩水経鼻投与調製液

遺伝子組み換えヒトG-CSF (rhG-CSF) に表※

*する技術を適用することも可能である。

【0023】投与形態は、各々の粘膜に適した投与形態を用いることができる。たとえば鼻腔に適用する場合は、滴下容器、または鼻腔用エアゾールアプリーターなどを用いて鼻腔内に滴下あるいは噴霧投与する方法が適している。また、肺に適用する場合は、ネブライザーまたは吸入用エアゾールアプリーターなどを用いて吸入する方法が適している。

【0024】本発明の製剤におけるヒトG-CSFの投与量は対象の患者の病状を配慮して決めることができるが、通常成人一人1回当たり0.1μg~10mgの範囲から適宜選択される。

【0025】界面活性剤の含量は、製剤全容量の0.001~10% (w/v)、好ましくは0.01~5% (w/v) の量が用いられる。

【0026】以下本発明を実験例（薬理効果）および実施例（製剤例）をあげて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0027】

【実施例】

実験例1（経鼻吸収）

SD系雄性ラット（250~350g）を麻酔下マイクロピペットを用いて下記のヒトG-CSF調製液を外鼻孔より投与し、投与後48時間にわたり、尾静脈より採血を行い総白血球数を測定し、その変化を観察した。

【0028】薬理学的利用率（利用率）は白血球増加率を指標とし皮下投与（10μg/kg）後48時間の血中白血球増加率時間曲線下の面積（AUC）を100%とし、経鼻投与（100μg/kg）後48時間のAUC増加量を求め次式より算出した。さらに、吸収促進剤の効果を、無添加（対照）の利用率を100%としてその増加率を算出した。結果を表1に示した。

【0029】

40※1の吸収促進剤を加え、pH6.5、比浸透圧（対生理食塩水）を1、rhG-CSFを250μg/mlおよび吸収促進剤を10mg/ml（1.0%）となるように調製して経鼻投与剤を得た。

【0030】

表 1

	界 面 活 性 剤	利用率 (%) 0-48h	増加率 (%) 0-48h
実 施 例	POE (4.2) ラウリルエーテル	9.8	128.9
	POE (9) ラウリルエーテル	19.5	256.6
	POE (10) ラウリルエーテル	12.8	168.7
	POE (21) ラウリルエーテル	10.3	135.5
	POE (7) オレイルエーテル	9.9	130.3
	POE (10) オレイルエーテル	13.6	178.9
	POE (20) オレイルエーテル	15.1	198.7
	POE (10) ノニルフェニルエーテル	14.2	186.8
	POE (10) オクチルフェニルエーテル	10.2	134.2
	POE (20) ポリオキシプロピレン (8) セチルエーテル	11.7	153.9
比 較 例	対照 (無添加)	7.6	100.0
	タウロコール酸	7.5	98.7
	POE (40) 硬化ヒマシ油	3.2	42.1

POE : ポリオキシエチレン

実験例2 (経肺吸収)

SD系雄性ラット (250~350g) を麻酔下で首頸部を切開後、気管を露出し、ポリエチレンチューブ (PE240: ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) を気管支内部にカニューレを施した。下記のヒトG-CSF調製液をPE240より細いポリエチレンチューブ (PE50: ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー社製) を用い、シリンジに接続後肺に投与した。生物学的利用率 (利用率) を算出する目的でラットに皮下投与を行った。投与後、経時的に外腸骨動脈より

30 *り採血し、得られた血漿からG-CSF濃度をEIA法を用いて8時間までの血中濃度を測定した。生物学的利用率 (利用率) はG-CSFの血中濃度を指標とし、皮下投与 (100μg/kg) 後8時間の血中G-CSF濃度時間曲線下の面積 (AUC) を100%とし、経肺投与 (100μg/kg) 後8時間のAUCを求め、次式より算出した。さらに吸収促進剤の効果は無添加経肺投与の利用率を100%としてその増加率を算出した。
【0031】

$$\text{利用率 (\%)} = \frac{\text{AUC (ip)}}{\text{AUC (sc)}} \times \frac{\text{sc投与量}}{\text{ip投与量}} \times 100$$

ip: 経肺投与
sc: 皮下投与
調製液

遺伝子組み換えヒトG-CSF (rhG-CSF) に吸収促進剤を加え、pH6.5、比浸透圧 (対生理食塩水 ※

※水) を1、rhG-CSFを250μg/mlおよび吸収促進剤を10mg/ml (1.0%) となるように調製して経肺投与剤を得た。

【0032】

表 2

	血 中 G-C S F 濃 度 ng/ml						利用率 (%)	増加率 (%)
	0.5 (時間)	1	2	4	6	8		
投与後の時間								
無 添 加 (本発明)	3.9	6.1	22.7	82.4	58.4	44.4	27.4	100.0
POE(9) ラウリルエーテル (本発明)	401.9	345.8	240.1	112.6	53.6	27.8	88.1	321.5

実験例3 (経肺吸収)

SD系雄性ラット(250~350g)を麻酔下で首頸部を切開後、気管を露出し26Gの注射針を接続したシリンジを用いて気管支内部に直接ヒトG-CSF調製液を注入した。投与後48時間(10 μ g/kg)或いは72時間(50、100、200 μ g/kg)に亘り尾静脈より採血を行い、総白血球数を測定しその変化を観察した。投与経路による薬理学的利用能を比較する目的で、同様のヒトG-CSF調製液を皮下並びに静脈内投*

*与した。各投与経路における白血球増加率(投与前の白血球数を基準とする)は、投与後48時間(10 μ g/kg)或いは72時間(50、100、200 μ g/kg)の血中白血球増加率時間曲線下の面積(AUC:% \cdot hr)を算出し、比較した。遺伝子組み換えヒトG-CSF(rhG-CSF)の投与量は、投与経路によらず10、50、100及び200 μ g/kgである。
【0033】

表 3

	各投与量毎のAUC (%・hr)			
	10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	50 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	100 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	200 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
皮下投与 (SC)	6163.5	10259.3	11214.8	11485.2
静脈内投与 (iv)	6133.9	9550.0	10093.7	11021.3
経肺投与 (lp)	5855.4	10838.7	12479.2	15169.4

〔実施例1〕遺伝子組換えヒトG-CSFおよびポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテルの最終濃度がそれぞれ $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\text{mg}/\text{ml}$ となるようにリン酸緩衝液で調製することによりpH6.5、比浸透圧(対生理食塩水)1の経鼻投与および経肺投与製剤が得られる。

【0034】〔実施例2〕遺伝子組換えヒトG-CSFおよびポリオキシエチレン(20)オレイルエーテルの最終濃度がそれぞれ $5\text{mg}/\text{ml}$ 、 $10\text{mg}/\text{ml}$ となるようにリン酸緩衝液で調製することによりpH6.5、比浸透圧(対生理食塩水)1の経鼻投与製剤が得られる。

【0035】〔実施例3〕遺伝子組換えヒトG-CSF*

*およびポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテルの最終濃度がそれぞれ $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\text{mg}/\text{ml}$ となるようにリン酸緩衝液で調製することによりpH6.5、比浸透圧(対生理食塩水)1の経鼻投与製剤が得られる。

【0036】

【発明の効果】ヒトG-CSFを単独投与することによりまたはヒトG-CSFに特定の非イオン性界面活性剤を配合することにより、優れた吸収性を持つ経粘膜投与剤が得られ、これによって、ヒトG-CSFの投与を容易かつ効率的に行うことならびに局所および全身においても効果が発揮され、適応する疾患に応じた広い治療領域で使用することが可能になる。

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】 日本国特許庁 (JP)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開平 5 - 3 3 9 1 6 4	(11)[UNEXAMINED PATENT NUMBER] Unexamined Japanese Patent 5-339164
(43)【公開日】 平成 5 年 (1 9 9 3) 1 2 月 2 1 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] December 21st, Heisei 5 (1993)
(54)【発明の名称】 経粘膜投与剤	(54)[TITLE] Transmucous administration agent
(51)【国際特許分類第 5 版】 A61K 37/02 ABY 8314- 4C ADU ADY 9/00 V 7329- 4C 47/34 E 7433- 4C	(51)[IPC] A61K 37/02 ABY 8314-4C ADUADY9/00 V 7329-4C 47/34 E 7433-4C
【審査請求】 未請求	[EXAMINATION REQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 6	[NUMBER OF CLAIMS] Six
【全頁数】 7	[NUMBER OF PAGES] Seven
(21)【出願番号】 特願平 5 - 3 3 4 2 4	(21)[APPLICATION NUMBER] Japanese Patent Application No. 5-33424
(22)【出願日】 平成 5 年 (1 9 9 3) 2 月 2 3 日	(22)[DATE OF FILING] February 23rd, Heisei 5 (1993)

(31)【優先権主張番号】

特願平4-43383

(31)[PRIORITY FILING NUMBER]

Japanese Patent Application No. 4-43383

(32)【優先日】

平4(1992)2月28日

(32)[DATE OF EARLIEST CLAIMED PRIORITY]

Heisei 4 (1992) February 28th

(33)【優先権主張国】

日本(JP)

(33)[COUNTRY OF EARLIEST PRIORITY]

Japan (JP)

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000003311

[ID CODE]

000003311

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 栗津 莊司

Shoji Awazu

【住所又は居所】

埼玉県川口市芝中田1-23-23

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 林 正弘

Masahiro Hayashi

【住所又は居所】

神奈川県茅ヶ崎市東海岸南1-13-3

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 町田 実

Minoru Machida

【住所又は居所】

[ADDRESS]

東京都豊島区高田 3 丁目 4 1 番
8 号 中外製薬株式会社内

(74) 【代理人】

(74) [PATENT AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

湯浅 恭三 (外 5 名)

Kyozo Yuasa (et al.)

(57) 【要約】

(57) [SUMMARY]

【構成】

ヒト G-C S F を有効成分とする経粘膜投与剤。さらに詳しくは、ヒト G-C S F 単独もしくは、ヒト G-C S F にポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系又はポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル系から選択される非イオン性界面活性剤である吸収促進剤を添加した経粘膜投与剤。

[SUMMARY OF THE INVENTION]

The transmucous administration agent of this invention contains a human G-CSF as an active ingredient.

Specifically, the transmucous administration agent contains a human G-CSF independently or a human G-CSF and an absorption enhancer which is a nonionic surfactant selected from a polyoxyethylene alkyl ether type|system|group, a polyoxyethylene alkylphenyl ether type|system|group, or a polyoxyethylene polyoxypropylene ether type|system|group.

【効果】

優れた経粘膜吸収を持つヒト G-C S F 投与剤を提供することに成功した。この結果、ヒト G-C S F の投与を容易かつ効率的に行うことならびに局所および全身においても効果が発揮され、適応する疾患に応じた広い治療領域で使用する事が可能になった。

[EFFECTS]

This invention succeeded in providing the human G-CSF administration agent with excellent transmucous absorption.

Consequently, an effect of easily and efficiently administering the human G-CSF for the patient is demonstrated and also the effect is exerted on the affected part, and the whole body. The agent is applicable to wide range of treatments depending on the adapted disease.

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項 1】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子を有効成分とする経粘膜投与剤。

[CLAIM 1]

A transmucous administration agent which contains a human granulocyte colony-stimulating factor as an active ingredient.

【請求項 2】

経粘膜投与剤が経肺投与剤である請求項 1 記載の経粘膜投与剤。

[CLAIM 2]

A transmucous administration agent of Claim 1 in which the transmucous administration agent is a transpulmonary administration agent.

【請求項 3】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子および吸収促進剤を含有する経粘膜投与剤。

[CLAIM 3]

A transmucous administration agent containing a human granulocyte colony-stimulating factor and an absorption enhancer.

【請求項 4】

吸収促進剤が、ポリオキシエチレン (4.2) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (9) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (10) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (21) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (7) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (20) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (10) ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン (20) セチルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも 1 つの界面活性剤である請求項 3 記載の経粘膜投与剤。

[CLAIM 4]

A transmucous administration agent of Claim 3 in which the absorption enhancer is at least one surfactant chosen out of a group which consists of polyoxyethylene (4.2) lauryl ether, a polyoxyethylene (9) lauryl ether, a polyoxyethylene (10) lauryl ether, a polyoxyethylene (21) lauryl ether, polyoxyethylene (7) oleyl ether, Polyoxyethylene (10) oleyl ether, polyoxyethylene (20) oleyl ether, a polyoxyethylene (10) nonylphenyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether and polyoxyethylene (20) polyoxypropylene (8) cetyl ether.

【請求項 5】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子お

[CLAIM 5]

A nasal or a transpulmonary administration

よび吸収促進剤を含有する経鼻
または経肺投与剤。

agent containing a human granulocyte colony-
stimulating factor and an absorption enhancer.

【請求項 6】

吸収促進剤が、ポリオキシエチレン (4.2) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (9) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (10) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (21) ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン (7) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (20) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (10) ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン (20) ポリオキシプロピレン (8) セチルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも 1 つの界面活性剤である請求項 5 記載の経鼻または経肺投与剤。

[CLAIM 6]

A nasal or a transpulmonary administration agent of Claim 5 in which the absorption enhancer is at least one surfactant chosen out of a group which consists of a polyoxyethylene (4.2) lauryl ether, a polyoxyethylene (9) lauryl ether, a polyoxyethylene (10) lauryl ether, a polyoxyethylene (21) lauryl ether, a polyoxyethylene (7) oleyl ether, Polyoxyethylene (10) oleyl ether, polyoxyethylene (20) oleyl ether, a polyoxyethylene (10) nonylphenyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether and polyoxyethylene (20) polyoxypropylene (8) cetyl ether

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

[0001]

【産業上の利用分野】

本発明はヒト顆粒球コロニー刺激因子（以下、ヒト G-CSF と略記する）を有効成分として含有する経粘膜投与用製剤に関する。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the pharmaceutical preparation for transmucous administration which contains a human granulocyte colony-stimulating factor (it abbreviates as human G-CSF hereafter) as an active ingredient.

【0002】

[0002]

【従来技術】

[PRIOR ART]

ヒトG-CSFはin vitroの実験系において顆粒球の前駆細胞に働き顆粒球への分化増殖を促す機能を有している液性の造血因子（例えば、Metcalf, et.al:Exp.Hematol.1.185, (1973)等参照）として知られている。さらに最近では、ヒトG-CSFの機能として好中球のプールからの血管内への遊出促進、遊走能亢進、好中球生存期間の延長および好中球活性化（食食、殺菌能亢進）などが知られている。

【0003】

現在、ヒトG-CSFは、骨髄移植（BMT）の際、および癌化学療法時の好中球減少症、種々の骨髄性血液疾患、後天性免疫不全症候群（AIDS）および感染症の治療に際し、静脈内投与および皮下投与が行われている。これ等疾患はいずれも重篤であり、しかも連日の投与による治療を必要とすることから、注射の投与による苦痛をなくすため、非-非経口投与（Non-parenteral）ルートの開発が望まれている。

【0004】

今までに薬理的に活性なペプチド及び蛋白質の経口投与による生物学的利用能の検討が試みられているが、胃腸管に存在する蛋白質分解酵素の作用により、一般の薬物に比べて低いことが知られている。このため蛋白質分解酵素の活性が胃腸管に比べて低いことが期待される鼻粘

Human G-CSF are known as the hemopoiesis factor (for example, Metcalf, et.al:Exp.Hematol.1.185, etc. reference (1973)) of the liquid which has the function of urging the differentiation proliferation to a role granulocyte to the precursor cell of a granulocyte in the experiment type|system|group of in vitro.

Furthermore recently, migration promotion of the intravascular toward from the pool of a neutrophil, a migration ability enhancement, extension of the neutrophil survival time, neutrophil activation (a phagocytosis, sterilization ability enhancement), etc. are known as a function of human G-CSF.

【0003】

Currently, human G-CSF, In the case of a bone marrow transplantation (BMT)

And in the case of the treatment of the neutropenia at the time of a cancer chemotherapy, various bone marrow property blood disease, an acquired immune deficiency syndrome (AIDS), and the infectious disease The intravenous administration and the subcutaneous administration are performed.

Each disease, such as this, is serious and the treatment by administration of every day is necessary.

From these, in order to abolish the pain by administration of injection, development of a non- parenteral administration (Non-parenteral) route is desired.

【0004】

Study of the bioavailability by the oral administration of a peptide and a protein active former pharmacologically is tried.

However, the low thing is known by the effect of the protease which exists in a gastrointestinal tract, compared with the common drug.

Therefore research of the administration route through the nasal mucosa, oral mucous membrane, direct intestinal mucosa, and vagina mucous membrane, the conjunctiva, the lung

膜、口腔粘膜、直腸粘膜、膣粘膜、眼粘膜および肺粘膜等を介した投与ルートの研究が注目されている。中でも蛋白質の経鼻からの透過性については、投与方法の容易さ、胃腸管よりも蛋白質分解酵素活性が低いこと、肝初回通過効果の回避の可能性のあること、あるいは投与後循環血中に比較的速やかに出現するという幾つかの有利さから多くの研究報告がある (Y. W. Chien et al; CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst, 4 (2): 67-194 (1987))。

【0005】

インスリン、インターフェロン、カルシトニンなどについては経鼻投与が検討され、特許出願もされている (特開昭63-115821号、特開昭62-207226号及び特開昭61-126034号参照)。

【0006】

ヒトG-CSFの経鼻投与については、東らがセンダイウイルスによる局所感染に対するヒトG-CSFの防御効果を検討している (東ら、Vaccine, 7: 229-233 (1989))。しかしながら、本発明とは異なりを目的とし、吸収率をあげるために吸収促進剤を用いているものではない。

【0007】

なお、インターフェロン、カルシトニンなどについては、経肺

mucous membrane, etc. it is anticipated that it is that the activity of a protease is low compared with a gastrointestinal tract attracts attention.

About the permeability from a proteinic per nasal among them, Ease of the administration method, a protease activity is lower than a gastrointestinal tract, Possibility of evasion of a liver first-pass effect, Or that appeared comparatively quickly in circulation blood after administration. There is many research report from several profitableness of an above. (Y. W. Chien et al; CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst, 4(2):67-194 (1987)).

[0005]

A transnasal administration is examined about an insulin, interferon, and a calcitonin, and the patent application is also carried out (refer Unexamined Japanese Patent 63-115821, Unexamined Japanese Patent 62-207226, and Unexamined Japanese Patent 61-126034).

[0006]

About the transnasal administration of human G-CSF, Azuma et.al are examining the defense effect of human G-CSF with respect to affected part the infection by the Sendai virus (Azuma et.al, Vaccine, 7:229-233 (1989)).

However, it is the objective from which this invention differed, and the absorption enhancer is not used in order to raise an absorption factor.

[0007]

In addition, a transpulmonary administration is examined about interferon and a calcitonin. The

投与が検討され、特許出願（特開昭63-51868号および特開昭60-161924号）されているが、ヒトG-CSFの経肺投与についての報告は現在のところなされていない。

patent application (Unexamined Japanese Patent 63-51868 and Unexamined Japanese Patent 60-161924) is carried out.

However, now, the report about the transpulmonary administration of human G-CSF is not made.

【0008】

[0008]

【発明が解決しようとする問題点】

経鼻投与では、分子量が約1,000以下の蛋白質はそのままでも良好に吸収されるが、それ以上の分子量のものはそのままでは粘膜透過しないと言われている（C. McMartin, et al: J. Pharm. Sci., 76(7):535-540 (1987)）。これに対して、ヒトG-CSFの分子量は20,000前後であるため、粘膜を通して投与することは困難であるとされていた。したがって各粘膜からの吸収率をあげるための簡便な方法およびすぐれた吸収促進剤の開発が望まれていた。

[PROBLEM ADDRESSED]

In a transnasal administration, a molecular weight of about 1,000 or less protein is absorbed satisfactorily as it is.

However, if the molecular weight of more remains as it is, it is said that mucous membrane permeation is not carried out (C. McMartin, et al: J. Pharm. Sci., 76(7):535-540 (1987)).

On the other hand, since the molecular weight of human G-CSF was before and after 20,000, it was made difficult to pass through and administer a mucous membrane.

Therefore development of the simple method for raise the absorption factor from each mucous membrane and the outstanding absorption enhancer was desired.

【0009】

[0009]

【問題点を解決するための手段】

本発明者らは、ヒトG-CSFの吸収を促進させ、かつ実用に供し得る経粘膜投与形態について鋭意研究を重ねた結果、ある種のポリオキシエチレンアルキルエーテル系及びポリオキシエチレンポリプロピレンアルキル

[SOLUTION OF PROBLEMS]

The present inventors accelerates absorption of human G-CSF.

And research was earnestly piled up about the transmucous administration form which can be used for practically.

As a result When added to the human G-CSF transnasal administration agent, having set the nonionic surfactant of a certain kind of polyoxyethylene alkyl ether type|system|group, and a polyoxyethylene polypropylene alkyl

エーテル系の非イオン性界面活性剤を吸収促進剤としてヒトG-CSF経鼻投与剤に添加したところ速やかに吸収されることを見出した。また、吸収促進剤を用いずにヒトG-CSFを経肺投与したところ意外にも良好に吸収され、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系非イオン性界面活性剤を吸収促進剤として添加したところさらに速やかに吸収され、各々の粘膜にヒトG-CSF単独でも、吸収促進剤を添加しても局所および全身作用として有用であることを見出し本発明を完成した。

[0010]

すなわち本発明は、ヒトG-CSFを有効成分として含有する経粘膜剤、ヒトG-CSFおよび吸収促進剤を含有する経粘膜剤または、ヒトG-CSFと、吸収促進剤としてポリオキシエチレン(4, 2)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(21)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(7)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテルからなる群より選ばれた少なくとも1つの界面活

ether type|system|group as the absorption enhancer, it found out being absorbed quickly.

Moreover, when carrying out the transpulmonary administration of the human G-CSF not using an absorption enhancer, unexpectedly, it is absorbed satisfactorily. When adding it, setting a polyoxyethylene alkyl ether type|system|group nonionic surfactant as an absorption enhancer, it is absorbed further quickly. Even when a human G-CSF independent adds an absorption enhancer to each mucous membrane, it is useful as the affected part and a whole body effect. The above was discovered and this invention was completed.

[0010]

That is, this invention, the transmucous agent which contains human G-CSF as an active ingredient, the transmucous agent containing human G-CSF and an absorption enhancer Or, human G-CSF, as an absorption enhancer A polyoxyethylene (4.2) lauryl ether, a polyoxyethylene (9) lauryl ether, a polyoxyethylene (10) lauryl ether, A polyoxyethylene (21) lauryl ether, polyoxyethylene (7) oleyl ether, Polyoxyethylene (10) oleyl ether, polyoxyethylene (20) oleyl ether, A polyoxyethylene (10) nonylphenyl ether, the poly and polyoxyethylene (10) octylphenyl ether Oxyethylene (20) polyoxypropylene (8) cetyl ether It is related with the pharmaceutical preparation for transmucous administration containing the surfactant of the at least one chosen out of the group which consists of an above.

性剤とを含有する経粘膜投与用製剤に関するものである。

【0011】

本発明で用いられるヒトG-CSFは純度の高いヒトG-CSFであればその由来が制限されるものではなく、例えば人の生体試料から抽出、分離、精製したもの、ヒトG-CSF産生細胞を培養し、その培養上清から単離したもの、細胞融合法を用いてヒトG-CSF産生ハイブリドーマを形成しそれから取得したもの、遺伝子組換えによって、大腸菌、動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめ単離精製したもの、又は天然のヒトG-CSFのアミノ酸配列に化学修飾を施したもの等のいずれも使用することができる。

【0012】

本発明に供せられうるヒトG-CSFの例としては、下記のアミノ酸配列であらわされるヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたはこれと糖鎖部を有する糖蛋白質を挙げることができる。

【0013】

(Met)_n Thr Pro Leu Gly Pro
Ala Ser Ser Leu
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
Cys Leu Glu Gln
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly
Ala Ala Leu
Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)_m
Cys Ala Thr
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu
Glu Leu Val Leu

[0011]

The origin will not be limited if human G-CSF used with this invention is human G-CSF with high purity. For example, the thing which the thing was extracted, isolated and refined, and the human G-CSF production cell were cultivated from people's biological sample, and was isolated from the culture supernatant liquid, the thing the human G-CSF production hybridoma was formed using the cell fusion method, and was acquired, the thing was therefore isolate-purified gene recombinant by making it produce from the transformed body which transformed and obtained hosts, such as an Escherichia coli and an animal cell, Or the thing which chemically modified to the natural amino acid sequence of human G-CSF, All, such as an above, can be used.

[0012]

As the example of human G-CSF with which this invention is provided Polypeptide which has the human G-CSF activity expressed with the following amino acid sequence, or the glycoprotein which has this and a sugar chain part can be mentioned.

[0013]

(Met)_n Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)_m Cys Ala Thr
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu
Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu
Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp

Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
 Trp Ala Pro
 Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln
 Ala Leu Gln Leu
 Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
 His Ser Gly Leu
 Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu
 Gln Ala Leu Glu
 Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro
 Thr Leu Asp
 Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 Asp Phe Ala Thr
 Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu
 Leu Gly Met
 Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln
 Gly Ala Met
 Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 Gln Arg Arg Ala
 Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His
 Leu Gln Ser
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val
 Leu Arg His

Leu Ala Gln Pro (但しmは0
 または1を表し、nは0または
 1を表す)

さらに、上記アミノ酸配列の一
 部を別のアミノ酸を付加し又は
 置換して改変したもの、アミノ
 酸配列の一部を欠損させたも
 の、またはアミノ酸配列に高分
 子化合物等の化合物を結合させ
 て化学修飾したもの等のヒトG
 -CSF活性を有するポリペプ
 チド類も本発明の範囲に含まれ
 る。

【0014】

上記のヒトG-CSFは例え
 ば、本出願人が先に出願した特
 開昭61-227526号、特
 開昭62-236497号、特
 開昭62-236488号の各
 明細書に記載の方法によって製
 造することができる。また、そ

Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr
 Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu GluLeu Gly Met
 Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
 Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala
 Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
 Leu Ala Gln Pro
 (however m shows 0 or 1, n shows 0 or 1.)

Furthermore, the thing which added another
 amino acid, or substituted a part of above amino
 acid sequence, and changed it, the thing which
 made a part of amino acid sequence suffer
 deficit a loss, Or the thing chemically modified
 by making an amino acid sequence couple
 compounds, such as a high molecular
 compound Polypeptide which has human G-
 CSF activities, such as an above, is contained
 in the range of this invention.

[0014]

Human G-CSF of an above can be produced by
 the method of a description on each
 specifications of Unexamined Japanese Patent
 61-227526, Unexamined Japanese Patent 62-
 236497 and the Unexamined Japanese Patent
 62-236488 for which this applicant applied
 previously, for example.

Moreover, it can also obtain by cultivating the

他の方法としてG-C S F 産生細胞と自己増殖能を有する悪性腫瘍とを細胞融合して得られるハイブリドーマをマイトジェンの存在または非存在下で培養することによって得ることもできる。これらの方法で得たヒトG-C S Fは全て本発明に含まれる。

【0015】

得られたヒトG-C S F 含有液は必要により公知の手段でさらに精製、濃縮した後、ミリポアフィルター等で無菌濾過して凍結保存とするかまたは凍結乾燥、真空乾燥などの手段により水分を除去して保存することができる。

【0016】

本発明の吸収促進剤としては、ポリオキシエチレン (POEと略記する) (4.2) ラウリルエーテル、POE (9) ラウリルエーテル、POE (10) ラウリルエーテル、POE (21) ラウリルエーテル、POE (7) オレイルエーテル、POE (10) オレイルエーテル、およびPOE (20) オレイルエーテルからなる群より選ばれるポリオキシエチレンアルキルエーテル系非イオン性界面活性剤、またはPOE (10) ノニルフェニルエーテルおよび、POE (10) オクチルフェニルエーテルからなる群より選ばれるポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系非イオン性界面活性剤またはPOE (20) ポリオキシプロピレン (8) セチルエ

hybridoma obtained as the other method by carrying out the cell fusion of a G-CSF production cell and the malignant tumor which has self-reproduction potency by the presence or the nonexistence of a mitogen.

All human G-CSFs obtained by these methods are contained in this invention.

【0015】

The obtained human G-CSF -containing liquid, After carrying out refinement and concentration further with well-known means if necessary, by the Millipore filter etc., sterile filtration is carried out and it cryopreserves. Or water content is removed by means, such as freeze-dried and vacuum drying, and it can preserve.

【0016】

As the absorption enhancer of this invention, A polyoxyethylene (it abbreviates as POE) (4.2) lauryl ether, POE (9) lauryl ether, POE(10) lauryl ether, POE (21) lauryl ether, POE(7) oleyl ether, POE(10) oleyl ether and POE(20) oleyl ether The polyoxyethylene alkyl ether type|system|group nonionic surfactant chosen out of the group which consists of an above, Or the polyoxyethylene alkylphenyl ether type|system|group nonionic surfactant chosen out of the group which consists of a POE(10) nonylphenyl ether and POE(10) octylphenyl ether Or POE(20) polyoxypropylene (8) cetyl ether (polyoxyethylene polyoxypropylene type|system|group nonionic surfactant) (made by Japanese emulsion company or made by Nikko Chemicals company) A surfactant (1 or 2 or more) is used among aboves.

ーテル（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン系非イオン性界面活性剤）（日本エマルジョン社製又は、日光ケミカルズ社製）のうち1または2以上の界面活性剤が用いられる。

[0017]

そして、上記界面活性剤のうちHLBが10以上であるもの、または、それらの2以上の組み合わせによりHLBが10以上になるような混合物を用いることにより、望ましい効果が得られる。

[0018]

この製剤が適用可能な粘膜としては、鼻腔、口腔、眼、肺、子宮、膣、直腸などの粘膜が考えられ、全身または局所でのヒトG-CSFの作用が期待できる部位が望ましい。

[0019]

投与剤形は、ヒトG-CSFまたはヒトG-CSFおよび上記の界面活性剤を粘膜に適用できる水などの液体希釈剤に溶解あるいは懸濁して水性溶液もしくはヒドロゲル（徐放性ゲルにしても良い）とするか、またはガス状の媒体に分散させエアゾール、噴霧スプレーとするか、または、粉末状の担体中に希釈して微粉末製剤とするか、または、軟膏剤または、クリーム剤とすることができる。更に、坐薬のような固形剤にすることもできる。

[0020]**[0017]**

And, the thing whose HLB is 10 or more among above surfactants, Or, the mixture from which HLB becomes 10 or more with their combinations of 2 or more A preferable effect is obtained by using an above.

[0018]

As a mucous membrane which can apply this pharmaceutical preparation, mucous membranes, such as a nasal cavity, an oral cavity, eyes, lungs, a uterus, a vagina, and the rectum, can be considered. The part which can expect an effect of human G-CSF on the whole body or the affected part is preferable.

[0019]

Administration formulation, It dissolves or suspends to liquid diluents, such as water which can apply the surfactant of human G-CSF or human G-CSF, and an above to a mucous membrane, and it makes as an aqueous solution or hydrogel (it may make sustained release gel). Or a gaseous medium is dispersed and it makes as aerosol and spraying spray. Or, it dilutes in a powder-like carrier and it sets as a fine powder pharmaceutical preparation. Or, it can set as an ointment or a cream agent.

Furthermore, it can also make the solid agent like a suppository.

[0020]

液体希釈剤としては注射用水またはリン酸、炭酸などの無機酸の緩衝液または酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-リン酸、酒石酸などの有機酸の緩衝液またはアミノ酸の溶液または、生理的食塩水などが用いられ、pH 3～8の範囲での適用が可能である。

【0021】

また、本発明の製剤には適宜、安定化剤、増粘剤、溶解補助剤、保存剤、増量剤、等張化剤、殺菌剤、防腐剤、ゲル化剤などを含有していてもよい。また、本発明の非イオン性界面活性剤以外の界面活性剤を安定化剤（吸着防止剤など）分散剤に用いることもできる。さらに肺に適用する場合は、気管支拡張剤または肺表面活性物質などを用いることによりさらに効果が期待される。

【0022】

本発明をさらに有効に利用する方法として、製剤の粘度を上げる技術（特開昭61-106509号）、付着粒子をつくる技術または、粘膜刺激を緩和する技術を適用することも可能である。

【0023】

投与形態は、各々の粘膜に適した投与形態を用いることができる。たとえば鼻腔に適用する場合は、滴下容器、または鼻腔用エアゾールアプリーケーターなどを用いて鼻腔内に滴下あるいは噴霧投与する方法が適してい

As a liquid diluent, the buffer of inorganic acids, such as water for injection or phosphoric acid, and carbonic acid, the buffer of organic acids, such as acetic acid-sodium acetate, citric acid-phosphoric acid, and tartaric acid, the solution of an amino acid, or a physiological sodium chloride solution is used. Application in the range of pH3-8 can be performed.

[0021]

Moreover, in the pharmaceutical preparation of this invention, a stabilizer, a thickener, a solubilizing agent, a preservative, an extender, an isotonicizing agent, a disinfectant/microbicide, antiseptic, a gelatinizer, etc. may be contained suitably.

Moreover, surfactants except for the nonionic surfactant of this invention can also be used for stabilizer dispersing agents (adsorption inhibitor etc.).

Furthermore when applying to lungs, an effect is further expected by using a bronchodilator or a lung surface active substance.

[0022]

As a method of utilizing this invention further effectively, the technique (Unexamined Japanese Patent 61-106509) which raises the viscosity of a pharmaceutical preparation, the technique which builds an adherence particle, or the technique which relieves a mucous membrane irritation is also applicable.

[0023]

The administration form suitable for each mucous membrane can be used for the administration form.

For example, when applying to a nasal cavity, the method of carrying out dripping or spraying administration at intranasal using a dripping container or the aerosol applicator for nasal cavities is suitable.

る。また、肺に適用する場合は、ネブライザーまたは吸入用エアゾールアプリーケーターなどを用いて吸入する方法が適している。

Moreover, when applying to lungs, the method of sucking using a nebulizer or the aerosol applicator for suction is suitable.

【0024】

本発明の製剤におけるヒトG-CSFの投与量は対象の患者の病状を配慮して決めることができるが、通常成人一人1回当たり0.1 μ g ~ 10mgの範囲から適宜選択される。

[0024]

The dosage of human G-CSF in the pharmaceutical preparation of this invention can consider and determine a object patient's condition of disease.

However, it selects from the range of g-10 mg of 0.1 micro-s per one adult person suitably usually.

【0025】

界面活性剤の含量は、製剤全容量の0.001~10% (w/v)、好ましくは0.01~5% (w/v)の量が用いられる。

[0025]

The content of a surfactant, 0.001-10% of formulation full capacity (w/v) Preferably, 0.01-5% (w/v) of quantity is used.

【0026】

以下本発明を実験例(薬理効果)および実施例(製剤例)をあげて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0026]

Below, the example (pharmacological effect) of experiment and an Example (FORMULATION) are given, and this invention is explained.

However, this invention is not limited to these.

【0027】

[0027]

【実施例】

実験例1 (経鼻吸収)

SD系雄性ラット(250~350g)を麻酔下マイクロピペットを用いて下記のヒトG-CSF調製液を外鼻孔より投与し、投与後48時間にわたり、尾静脈より採血を行い総白血球数を測定し、その変化を観察した。

[Example]

Experimental example 1 (per nasal absorption)

To SD type|system|group male rat (250-350g), under anesthesia and the following human G-CSF preparation liquid is administered from the naris using a micro pipet. After administration, through 48 hours, it takes blood from a caudal vein and the total number of leucocytes is measured.

The change was observed.

【0028】

薬理学的利用率(利用率)は白

[0028]

A pharmacological availability (utilization factor) make the rate of the leukocytosis the index.

血球増加率を指標とし皮下投与 (10 μ g/kg) 後48時間の血中白血球増加率時間曲線下の面積 (AUC) を100%とし、経鼻投与 (100 μ g/kg) 後48時間のAUC増加量を求め次式より算出した。さらに、吸収促進剤の効果を、無添加 (対照) の利用率を100%としてその増加率を算出した。結果を表1に示した。

Area (AUC) under 48 hours after a subcutaneous administration (10 micro-g/kg) rate time of the in-blood leukocytosis being curved is made into 100%.

The amount of transnasal administration (100 micro-g/kg) after 48 hours of increases in AUC was calculated, and it calculated from the following formula.

Furthermore, the rate of an increase was calculated, having set the effect of an absorption enhancer as 100% the utilization factor of non-addition (comparison).

The result was shown in Table 1.

【0029】

[0029]

$$\text{利用率 (\%)} = \frac{\text{AUC(In)} - \text{AUC(Cont)}}{\text{AUC(sc)} - \text{AUC(Cont)}} \times \frac{\text{sc投与量}}{\text{In投与量}} \times 100$$

$$\text{増加率 (\%)} = \frac{\text{利用率 (rhG-CSF + 吸収促進剤)}}{\text{利用率 (rhG-CSF)}} \times 100$$

Utilization factor, Dosage

Increasing rate, Utilization factor, Absorption enhancer

in : 経鼻投与

sc : 皮下投与

Cont : 生理的食塩水経鼻投与

調製液

遺伝子組み換えヒトG-CSF

(rhG-CSF) に表1の吸

収促進剤を加え、pH6.5、

比浸透圧 (対生理食塩水) を1、

rhG-CSFを250 μ g/

mlおよび吸収促進剤を10m

g/ml (1.0%) となるよ

うに調製して経鼻投与剤を得

In: Transnasal administration

Sc: Subcutaneous administration

Cont: Physiological sodium chloride solution transnasal administration preparation liquid

The absorption enhancer of Table 1 is added to gene recombination human G-CSF (rhG-CSF). That pH6.5 and a ratio osmotic pressure (pair physiological saline) might be set to 1, rhG-CSF was prepared so that the absorption enhancer and 250 micro-g/ml might be set to 10 mg/ml (1.0%), and the transnasal administration agent was obtained.

た。

【0030】

[0030]

表 1

	界 面 活 性 剤	利用率 (%) 0-48 h	増加率 (%) 0-48 h
実 施 例	POE (4.2) ラウリルエーテル	9.8	128.9
	POE (9) ラウリルエーテル	19.5	256.6
	POE (10) ラウリルエーテル	12.8	168.7
	POE (21) ラウリルエーテル	10.3	135.5
	POE (7) オレイルエーテル	9.9	130.3
	POE (10) オレイルエーテル	13.6	178.9
	POE (20) オレイルエーテル	15.1	198.7
	POE (10) ノニルフェニルエーテル	14.2	186.8
	POE (10) オクチルフェニルエーテル	10.2	134.2
	POE (20) ポリオキシプロピレン (8) セチルエーテル	11.7	153.9
比 較 例	対照 (無添加)	7.6	100.0
	タウロコール酸	7.5	98.7
	POE (40) 硬化ヒマシ油	3.2	42.1

POE: ポリオキシエチレン

Table 1

Row: Surfactant, Utilization factor, Increasing rate

Column: Example, Comparative example; Surfactant, Lauryl ether, Oleyl ether, Nonylphenyl ether, Octylphenyl ether, Polyoxypropylene (8) cetyl ether, Comparison (non-addition), Taurocholic acid, Hardened castor oil

POE: Polyoxyethylene

実験例 2 (経肺吸収)

SD系雄性ラット (250~350g) を麻酔下で首頸部を切開後、気管を露出し、ポリエチレンチューブ (PE240:ベクトン・ディッキンソン・アン

Experimental example 2 (transpulmonary absorption)

SD type/system/group male rat (250-350g) is been under anesthesia, and after cutting a head neck open, the trachea was exposed and cannula was given to the inside of a bronchus the polyethylene tube (PE240:Becton,

ド・カンパニー)を気管支内部にカニューレを施した。下記のヒトG-CSF調製液をPE240より細いポリエチレンチューブ(PE50:ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー社製)を用い、シリンジに接続後肺に投与した。生物学的利用率(利用率)を算出する目的でラットに皮下投与を行った。投与後、経時的に外腸骨動脈より採血し、得られた血漿からG-CSF濃度をEIA法を用いて8時間までの血中濃度を測定した。生物学的利用率(利用率)はG-CSFの血中濃度を指標とし、皮下投与(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)後8時間の血中G-CSF濃度時間曲線下の面積(AUC)を100%とし、経肺投与(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)後8時間のAUCを求め、次式より算出した。さらに吸収促進剤の効果は無添加経肺投与の利用率を100%としてその増加率を算出した。

Dickinson and Company).

The following human G-CSF preparation liquid was administered in the lungs after connection at the syringe using the polyethylene tube (made by a PE50:Becton, Dickinson and Company) thinner than PE240.

The subcutaneous administration was performed to the rat for the objective which calculates a bioavailability (utilization factor).

After administration, over time, from the external iliac artery, it took blood and the blood level by 8 hours was measured G-CSF concentration from the obtained plasma using EIA method.

A bioavailability (utilization factor) make the blood level of G-CSF the index.

Area (AUC) under 8 hours after a subcutaneous administration (100 micro-g/kg) in-blood G-CSF concentration time being curved is made into 100%.

AUC of transpulmonary administration (100 micro-g/kg) after 8 hours was calculated, and it calculated from the following formula.

Furthermore the effect of an absorption enhancer made 100% the utilization factor of an additive-free transpulmonary administration, and calculated the rate of an increase.

[0031]

[0031]

$$\text{利用率 (\%)} = \frac{\text{AUC (ip)}}{\text{AUC (sc)}} \times \frac{\text{sc 投与量}}{\text{ip 投与量}} \times 100$$

Utilization factor, Dosage

ip: 経肺投与

sc: 皮下投与

調製液

遺伝子組み換えヒトG-CSF (rhG-CSF) に吸収促進

Ip: Transpulmonary administration

Sc: Subcutaneous administration

Preparation liquid

An absorption enhancer is added to gene recombination human G-CSF (rhG-CSF). pH6.5, Ratio osmotic pressure 1. (pair

剤を加え、pH 6.5、比浸透
圧（対生理食塩水）を1、rh
G-CSFを250 μ g/ml
および吸収促進剤を10 mg/
ml（1.0%）となるように
調製して経肺投与剤を得た。

physiological saline), rhG-CSF250 micro-g/ml
And 10 mg/ml (1.0%) absorption enhancer It
prepared and the transpulmonary
administration agent was obtained so that it
might become in the above.

【0032】

[0032]

表 2

	血 中 G-CSF 濃 度 ng/μl						利用率 (%)	増加率 (%)
	0.5 (時間)	1	2	4	6	8		
投与後の時間								
無 添 加 (本発明)	3.9	6.1	22.7	82.4	58.4	44.4	27.4	100.0
POE (9) ラウリルエーテル (本発明)	401.9	345.8	240.1	112.6	53.6	27.8	88.1	321.5

Table 2

Elapsed time after administration, Non-additive (the present invention), lauryl ether, (the present invention); Blood G-CSF level, (hours); Utilization factor; Increasing rate

実験例 3 (経肺吸収)

SD系雄性ラット (250~350g) を麻酔下で首頸部を切開後、気管を露出し26Gの注射針を接続したシリンジを用いて気管支内部に直接ヒトG-CSF調製液を注入した。投与後48時間 (10 μ g/kg) 或いは72時間 (50、100、200 μ g/kg) に亘り尾静脈より採血を行い、総白血球数を測定しその変化を観察した。投与経路による薬理学的利用能を比較する目的で、同様のヒトG-CSF調製液を皮下並びに静脈内投与した。各投与経路における白血球増加率 (投与前の白血球数を基準とする) は、投与後48時間 (10 μ g/kg) 或いは72時間 (50、100、200 μ g/kg) の血中白血球増加率時間曲線下の面積 (AUC: % \cdot hr) を算出し、比較した。遺伝子組み換えヒトG-CSF (rhG-CSF) の投与量は、投与経路によらず10、50、100及び200 μ g/kgである。

[0033]

Experimental example 3 (transpulmonary absorption)

SD type|system|group male rat (250-350g) is been under anesthesia, and after cutting a head neck open, the direct human G-CSF preparation liquid was injected inside the bronchus using the syringe which exposed the trachea and connected the injection needle of 26G.

It takes blood from a caudal vein for 48 hours (10 micro-g/kg) or 72 hours (50, 100, 200 micro-g/kg) after administration. The total number of leucocytes was measured and the change was observed.

For the objective which compares pharmacology-use ability by the administration route, the similar human G-CSF preparation liquid was intravenously administered in the subcutaneous row.

The rate of the leukocytosis in each administration route (based on the number of leucocytes before administration), the area under rate time of the in-blood leukocytosis curved (AUC: %xhr) of 48 hours (10 micro-g/kg) or 72 hours (50, 100, 200 micro-g/kg) is calculated after administration.

It compared.

The dosage of gene recombination human G-CSF (rhG-CSF), It is not based on an administration route but they are 10, 50, 100, and 200 micro-g/kg.

[0033]

表 3

	各投与量毎のAUC (%・hr)			
	10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	50 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	100 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	200 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
皮下投与 (SC)	6163.5	10259.3	11214.8	11485.2
静脈内投与 (iv)	6133.9	9550.0	10093.7	11021.3
経肺投与 (lp)	5855.4	10838.7	12479.2	15169.4

Table 3

Column: Subcutaneous administration, Intravenous administration, Transpulmonary administration; AUC (% x hr) of each dosage

【実施例 1】

遺伝子組換えヒトG-CSFおよびポリオキシエチレン (9) ラウリルエーテルの最終濃度がそれぞれ500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1

[Example 1]

It prepares by phosphoric acid buffer so that the final concentration of a gene recombinant human G-CSF and polyoxyethylene (9) lauryl ether may respectively be set to 500 micro-g/ml and 10 mg/ml. Thereby, the transnasal

0 mg/mlとなるようにリン酸緩衝液で調製することにより pH 6.5、比浸透圧（対生理的食塩水）1の経鼻投与および経肺投与製剤が得られる。

administration and the transpulmonary administration pharmaceutical preparation of pH6.5 and the ratio osmotic pressure (pair physiological sodium chloride solution) 1 are obtained.

【0034】

[0034]

【実施例2】

遺伝子組換えヒトG-CSFおよびポリオキシエチレン(20)オレイルエーテルの最終濃度がそれぞれ5 mg/ml、10 mg/mlとなるようにリン酸緩衝液で調製することにより pH 6.5、比浸透圧（対生理食塩水）1の経鼻投与製剤が得られる。

[Example 2]

It prepares by phosphoric acid buffer so that the final concentration of gene recombination human G-CSF and polyoxyethylene (20) oleyl ether may respectively be set to 5 mg/ml and 10 mg/ml. Thereby, the transnasal administration pharmaceutical preparation of pH6.5 and the ratio osmotic pressure (pair physiological saline) 1 is obtained.

【0035】

[0035]

【実施例3】

遺伝子組換えヒトG-CSFおよびポリオキシエチレン(10)ノニルフェニルエーテルの最終濃度がそれぞれ500 μ g/ml、5 mg/mlとなるようにリン酸緩衝液で調製することにより pH 6.5、比浸透圧（対生理食塩水）1の経鼻投与製剤が得られる。

[Example 3]

It prepares by phosphoric acid buffer so that the final concentration of gene recombination human G-CSF and a polyoxyethylene (10) nonylphenyl ether may respectively be set to 500 micro-g/ml and 5 mg/ml. Thereby, the transnasal administration pharmaceutical preparation of pH6.5 and the ratio osmotic pressure (pair physiological saline) 1 is obtained.

【0036】

[0036]

【発明の効果】

ヒトG-CSFを単独投与することによりまたはヒトG-CSFに特定の非イオン性界面活性剤を配合することにより、優れた吸収性を持つ経粘膜投与剤が

[EFFECT OF THE INVENTION]

The independent administration of the human G-CSF is carried out. Or a specific nonionic surfactant is compounded with human G-CSF. The transmucous administration agent which thereby has excellent absorption is obtained. And it administers human G-CSF for the patient

得られ、これによって、ヒトG-CSFの投与を容易かつ効率的に行うことならびに局所および全身においても効果が発揮され、適応する疾患に応じた広い治療領域で使用する事が可能になる。

easily and efficiently, an effect is demonstrated also in the affected part and the whole body by this. It can use now in a wide treatment region depending on the adapted disease.

Translation ordered

4-24-2002

DERWENT-ACC-NO: 1994-031733
DERWENT-WEEK: 199404
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New drug via mucous membrane of good absorbing
activity - comprising
human granule colony stimulating factor/human G-CSF) and
absorption
accelerating agent

PATENT-ASSIGNEE: CHUGAI PHARM CO LTD[CHUS]

PRIORITY-DATA: 1992JP-0043383 (February 28, 1992)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 05339164 A	December 21, 1993	N/A
007	A61K 037/02	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP05339164A	N/A	1993JP-0033424
February 23, 1993		

INT-CL_(IPC): A61K009/00; A61K037/02 ; A61K047/34

ABSTRACTED-PUB-NO: JP05339164A

BASIC-ABSTRACT: New drug via mucous membrane comprises as
effective substance
human granule colony stimulating factor (human G-SCF) (and
absorption
accelerating agent).

Also new are the transnasal or transpulmonary agent contg.
human G-CSF and
absorption accelerating agent.

Transmucous membrane drug is pref. transpulmonary drug.
Absorption
accelerating agent is pref. at least one surfactant
selected from
polyoxyethylene (POE) (4,2) lauryl ether, POE(9) lauryl
ether, POE(10) lauryl
ether, etc. Human G-CSF is obtained by i) extn, sepn. and

purificn. of human
body; ii) culturing human G-CSF producing cells and
isolation of the obtd.
cultured supernatant; iii) forming human G-CSF producing
hybridoma by cell
fusion method; iv) gene recombination of E. Coli or host
cells of animal cells;
or v) chemically modified amino acid sequence of natural
human G-CSF. Examples
of mucous membrane are those of nasal cavity, oral cavity,
eye, lung, uterus,
vagina and rectum. The amt. of surfactant in whole prepn.
is 0.001-10 % (w/v),
pref. 0.01-5 % (w/v).

USE/ADVANTAGE - Single admin. of human G-CSF or combined
admin. of human G-CSF
and nonionic surfactant can give excellent transmucous
membrane drug with
efficient absorbing activity. The drug is administered
easily and efficiently,
showing effects topically as well as systematicall y. So it
can treat the
diseases in a wide range.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

NEW DRUG MUCOUS MEMBRANE ABSORB ACTIVE COMPRISE HUMAN
GRANULE COLONY
STIMULATING FACTOR HUMAN ABSORB ACCELERATE AGENT

DERWENT-CLASS: A96 B04

CPI-CODES: A10-E08A; A12-V01; B04-C03C; B04-H04A; B12-M02F;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M431 M782 M903 Q120 R022 V600 V641

Registry Numbers

1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U

Chemical Indexing M1 *02*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H5 H589 H8 M225 M231 M272 M281

M312 M323 M332 M342 M383 M393 M423 M431 M510 M520

M530 M540 M620 M782 M903 M904 M910 Q120 Q616 R022

V0 V743
Specific Compounds
01844U
Registry Numbers
1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U

Chemical Indexing M6 *03*
Fragmentation Code
M903 Q120 Q616 R022 R111 R210 R252 R253 R263 R272
R280 R290 R302 R319
Registry Numbers
1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 1844U

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0013 0231 1279 2002 2014 2569 2766 3273

Multipunch Codes: 017 028 04- 147 231 240 31- 525 532 533

59& 623 624 645

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1994-014530